

# NHÂN GIỐNG *in vitro* CÂY SA NHÂN ĐỎ (*Amomum villosum* Lour.)

Phan Thị Hạnh<sup>1</sup>, Phùng Đức Hiếu<sup>1</sup>,

Nguyễn Thị Hoà<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lan Anh<sup>1</sup>, Lưu Minh Nhật<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Khoa học Công nghệ và Môi trường

\*Email: hanh190723@gmail.com

## TÓM TẮT

Sa nhân đỏ (*Amomum Villosum* Lour.) thuộc họ gừng (Zingiberaceae) là một loài dược liệu quý. Quả Sa nhân đỏ chứa tinh dầu, với nhiều hợp chất hóa học giá trị như: Camphen,  $\beta$ -pinen, limonen, camphor, borneol, saponin... có tác dụng ức chế hoạt động của nhiều loại vi khuẩn. Bài báo này trình bày kết quả thí nghiệm nhân giống *in vitro* cây Sa nhân đỏ. Hom thân rễ mang mầm chồi của cây Sa nhân đỏ được khử trùng bằng dung dịch  $HgCl_2$  nồng độ 0,05% trong thời gian 13 phút là hiệu quả cao với tỷ lệ mẫu sạch đạt 87,78% và tỷ lệ mẫu bật mầm đạt cao nhất 55,56%. Công thức cấy phù hợp là lấy dao mổ chẻ làm đôi chồi lẻ Sa nhân đỏ theo hướng dọc thân và đặt nằm áp mặt cắt xuống môi trường, cấy từ 5 - 7 mẫu/bình môi trường cho số chồi/cụm sau tái sinh cao nhất 3,02 chồi/cụm sau 30 ngày. Khả năng tái sinh chồi tốt nhất đạt được trên môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l + KIN 1,0 mg/l với số chồi/cụm đạt cao nhất 5,32 chồi và chiều dài chồi là 6,32 cm sau 40 - 45 ngày. Giá thể phù hợp được sử dụng là giá thể bao gồm các thành phần ruột bầu với tỷ lệ 50% đất phù sa + 30% cát sông + 20% trấu hun cho tỷ lệ cây sống đạt 91,11% và chiều cao cây đạt 7,0 cm sau 30 ngày đưa cây ra vườn ươm.

**Từ khóa:** Sa nhân đỏ (*Amomum villosum* Lour.), khử trùng mẫu, nhân giống *in vitro*, chất điều hòa sinh trưởng, tái sinh chồi.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sa nhân là một trong những nhóm lâm sản ngoài gỗ có giá trị cao, được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền và công nghiệp chế biến thực phẩm, dược phẩm [1]. Trên thế giới, chi *Amomum* có khoảng 34 loài, riêng Việt Nam đã ghi nhận gần 30 loài, nhưng chỉ có một số loài cho năng suất và giá trị thương mại cao; trong đó Sa nhân đỏ (*Amomum villosum* Lour.) được xem là loài quan trọng nhất [2, 3]. Loài này phân bố rộng ở nhiều tỉnh miền núi và hiện mang lại nguồn thu nhập đáng kể cho người dân sống ven rừng nhờ sản lượng thu hái tự nhiên đạt hàng nghìn tấn mỗi năm, với giá xuất khẩu dao động 20 - 25 USD/kg quả khô [4].

Sa nhân đỏ có tác dụng dược lý quý như: Kháng khuẩn, hỗ trợ tiêu hóa, điều hòa huyết áp và được dùng làm nguyên liệu trong chế biến thực phẩm, hương liệu và mỹ phẩm, nên nhu cầu thị

trường ngày càng tăng [4]. Tuy nhiên, sản lượng Sa nhân ở nước ta vẫn chủ yếu dựa vào khai thác tự nhiên, trong khi diện tích trồng còn hạn chế. Tình trạng phá rừng, khai thác tự phát và thu hái quả non đã khiến trữ lượng giảm mạnh, chất lượng dược liệu không ổn định và khả năng tái sinh tự nhiên suy giảm [5].

Nhận thức được giá trị của nguồn cây được liệu này, một số địa phương như tỉnh Nghệ An, Lào Cai, Sơn La đã quy hoạch diện tích lớn để phát triển mô hình trồng Sa nhân đỏ dưới tán rừng. Tuy nhiên, yêu cầu về nguồn giống chất lượng cao và số lượng lớn đặt ra thách thức cho việc mở rộng vùng dược liệu. Công nghệ nhân giống *in vitro*, với ưu điểm hệ số nhân cao, đồng đều và sạch bệnh, trở thành giải pháp quan trọng cho công tác giống Sa nhân đỏ [6].

Nghiên cứu này trình bày kết quả bước đầu về nhân giống *in vitro* nhằm góp phần bảo tồn nguồn

gen và tạo cơ sở cung cấp cây giống chất lượng cao phục vụ phát triển vùng trồng Sa nhân cho các hợp tác xã trong nước.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Mẫu nghiên cứu được thu thập từ tỉnh Lào Cai. Vật liệu nuôi cấy ban đầu là hom thân rễ (hom gốc) mang chồi của cây Sa nhân đỏ (*Amomum villosum* Lour.).

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### *2.2.1. Khử trùng mẫu nuôi cấy*

Vật liệu nuôi cấy sử dụng trong thí nghiệm là mẫu chồi non được tách từ hom thân rễ mang mầm chồi của cây Sa nhân đỏ. Sau khi tách, mẫu chồi được rửa xà phòng, rửa nước, xử lý cồn 70% (1 - 2 phút) và khử trùng bằng  $\text{HgCl}_2$  0,05% hoặc Javen (2,5 - 5%). Sau khử trùng, mẫu được tráng nước vô trùng và cắt bỏ phần tiếp xúc hóa chất trước khi cấy vào môi trường MS. Các chỉ tiêu đánh giá: Tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ bật chồi sau 30 ngày.

#### *2.2.2. Phương pháp cấy mẫu*

Sau thời gian nuôi dưỡng 8 - 10 tuần, các cụm chồi Sa nhân đỏ được cắt tách và cấy theo các phương pháp khác nhau nhằm đánh giá khả năng bật chồi và tái sinh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Cụ thể:

Phương pháp 1 (cấy chồi đơn): Cắt bỏ lá và rễ, giữ lại một đoạn gốc có mắt chồi; chồi được cắm thẳng đứng vào môi trường nuôi cấy, mỗi bình cấy 8 - 10 chồi đơn.

Phương pháp 2 (chẻ dọc chồi): Chồi đơn được chẻ đôi theo hướng dọc thân bằng dao mổ vô trùng, đặt nằm áp mặt cắt xuống môi trường, mỗi bình cấy 5 - 7 mẫu.

Phương pháp 3 (cấy cụm chồi): Không cắt lẹ hoặc chẻ chồi, cấy nguyên cụm chồi gồm 2 - 3 chồi/cụm, mỗi bình cấy 3 - 5 cụm chồi.

Các mẫu sau cấy được nuôi trong cùng điều kiện thí nghiệm để theo dõi khả năng bật chồi và tái sinh.

#### *2.2.3. Tái sinh, nhân chồi in vitro*

Chồi sạch được cấy sang môi trường MS bổ sung đường 30 g/l, agar 5 g/l và chất điều hòa

sinh trưởng BAP ở nồng độ 1 mg/l kết hợp bổ sung KIN, IBA, NAA với các mức nồng độ khác nhau là 0,1 mg/l; 0,5 mg/l và 1 mg/l.

#### *2.2.4. Tạo cây hoàn chỉnh và xác định giá thể trồng cây ngoài vườn ươm*

Chồi được tạo rễ trên môi trường  $\text{MS}^* + \text{IBA}$  1 mg/l trong 30 ngày, huấn luyện 15 ngày, xử lý viben C 0,3%, sau đó trồng ra bầu chứa các giá thể khác nhau. Các giá thể gồm: Cát sông, đất phù sa, trấu hun với các công thức có tỷ lệ khác nhau: 100% cát sông; 100% đất phù sa; 50% đất phù sa + 50% trấu hun; 50% đất phù sa + 30% cát sông + 20% trấu hun.

Cây con sau thuần dưỡng được trồng vào bầu PE kích thước 8 ã 11 cm tại vườn ươm; bầu có đục lỗ thoát nước, đáp ứng yêu cầu sinh trưởng ban đầu và thuận lợi cho chăm sóc, theo dõi. Sau khi cấy ra vườn ươm, cây con được đặt dưới lưới che giảm ánh sáng 50 - 60%, duy trì ẩm độ giá thể thích hợp bằng tưới phun sương 4 - 5 lần/ngày trong 10 - 15 ngày đầu. Sau giai đoạn hồi phục, giảm dần che sáng và tần suất tưới, kết hợp kiểm soát sâu, bệnh và nấm hại; cây sinh trưởng ổn định được chăm sóc theo chế độ vườn ươm thông thường trước khi xuất vườn.

#### *2.2.5. Xử lý thống kê*

Mỗi công thức thí nghiệm bố trí với 3 lần lặp, mỗi lần lặp quan sát trên 30 mẫu. Số liệu thu thập được ghi chép vào bảng biểu, xử lý số liệu, tính giá trị trung bình, phân tích phương sai (ANOVA) bằng công cụ Data Analysis trong phần mềm Microsoft Excel để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm.

## **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Khử trùng mẫu nuôi cấy**

Công tác vô trùng mẫu vật liệu nuôi cấy mô đóng vai trò then chốt, quyết định sự thành công của quy trình nhân giống vô tính, với yêu cầu đảm bảo tỷ lệ nhiễm thấp, tỷ lệ mẫu sống cao và khả năng sinh trưởng, phân hóa tốt của mô [7 - 10]. Trên cơ sở kế thừa các nghiên cứu trước và tham khảo quy trình khử trùng trên các đối tượng cây trồng khác, nghiên cứu này tiến hành thử nghiệm  $\text{HgCl}_2$  0,05% và Javen 2,5% và 5% trên mẫu Sa nhân

đồ thu thập tại tỉnh Lào Cai (đã được Viện Khoa học thuốc Nam giám định). Kết quả được theo dõi trong 30 ngày nhằm đánh giá và lựa chọn phương án khử trùng phù hợp.

Hiệu quả của thời gian khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu bật chồi sau 30 ngày theo dõi. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của HgCl<sub>2</sub> 0,05%, Javen 2,5%, Javen 5% đến khả năng vô trùng mẫu Sa nhân đỏ**

| Hoá chất                | Công thức | Thời gian khử trùng (phút) | Tỷ lệ mẫu sạch (%)          | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)        | Tỷ lệ mẫu nảy chồi (%)      |
|-------------------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| HgCl <sub>2</sub> 0,05% | 1         | 9                          | 61,11 ± 49,02 <sup>c</sup>  | 38,89 ± 49,02 <sup>a</sup> | 20,00 ± 40,22 <sup>c</sup>  |
|                         | 2         | 11                         | 72,22 ± 45,04 <sup>b</sup>  | 27,78 ± 45,04 <sup>b</sup> | 25,56 ± 43,85 <sup>bc</sup> |
|                         | 3         | 13                         | 87,78 ± 32,93 <sup>ab</sup> | 12,22 ± 32,93 <sup>c</sup> | 55,56 ± 49,97 <sup>a</sup>  |
|                         | 4         | 15                         | 91,11 ± 28,63 <sup>a</sup>  | 8,89 ± 28,63 <sup>c</sup>  | 30,00 ± 46,08 <sup>b</sup>  |
| Javen 2,5%              | 5         | 10                         | 52,22 ± 1,92 <sup>a</sup>   | 47,78 ± 1,92 <sup>a</sup>  | 11,11 ± 1,92 <sup>c</sup>   |
|                         | 6         | 15                         | 61,11 ± 12,62 <sup>b</sup>  | 38,89 ± 12,62 <sup>b</sup> | 18,89 ± 3,85 <sup>b</sup>   |
|                         | 7         | 20                         | 73,33 ± 3,33 <sup>c</sup>   | 26,67 ± 3,33 <sup>c</sup>  | 27,78 ± 1,92 <sup>a</sup>   |
| Javen 5%                | 8         | 10                         | 54,44 ± 1,93 <sup>a</sup>   | 45,56 ± 1,93 <sup>a</sup>  | 21,11 ± 1,92 <sup>a</sup>   |
|                         | 9         | 15                         | 70,00 ± 5,77 <sup>b</sup>   | 30,00 ± 5,77 <sup>b</sup>  | 15,56 ± 1,93 <sup>b</sup>   |
|                         | 10        | 20                         | 83,33 ± 0,00 <sup>c</sup>   | 16,67 ± 0,00 <sup>c</sup>  | 11,11 ± 1,92 <sup>c</sup>   |

*Ghi chú: Giá trị trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD), n = 90. Các chữ cái khác nhau trong cùng một nhóm xử lý (cùng hóa chất) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P < 0,05. Phân tích thống kê được thực hiện bằng ANOVA một nhân tố đối với HgCl<sub>2</sub> và ANOVA hai nhân tố đối với Javen.*

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, loại hóa chất và thời gian khử trùng ảnh hưởng có ý nghĩa đến tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ nhiễm và khả năng nảy chồi của mẫu Sa nhân đỏ (P < 0,05).

Đối với HgCl<sub>2</sub> 0,05%, khi tăng thời gian xử lý từ 9 lên 15 phút, tỷ lệ mẫu sạch tăng từ 61,11% lên 91,11%, đồng thời tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 38,89% xuống 8,89%. Tuy nhiên, tỷ lệ nảy chồi đạt cao nhất tại thời gian xử lý 13 phút (55,56%) và giảm xuống 30,00% khi kéo dài thời gian xử lý đến 15 phút, cho thấy tác động bất lợi của HgCl<sub>2</sub> lên mô cấy khi vượt quá ngưỡng tối ưu.

Đối với Javen, kết quả phân tích ANOVA hai nhân tố cho thấy, nồng độ, thời gian xử lý và sự tương tác giữa hai nhân tố đều ảnh hưởng đến các chỉ tiêu đánh giá. Ở Javen 2,5%, tỷ lệ mẫu sạch tăng từ 52,22% (10 phút) lên 73,33% (20 phút), trong khi tỷ lệ nảy chồi đạt giá trị cao nhất tại 20 phút (27,78%). Tuy nhiên, kết quả này chỉ phản ánh xu hướng trong phạm vi thời gian khảo sát (10 - 20 phút), chưa đủ cơ sở để khẳng định việc kéo dài thời gian xử lý vượt quá 20 phút sẽ tiếp tục làm tăng đồng thời hiệu quả vô trùng và khả năng nảy chồi. Ở Javen 5%, mặc dù tỷ lệ mẫu sạch đạt 83,33% tại 20

phút, tỷ lệ nảy chồi giảm xuống còn 11,11%, cho thấy ảnh hưởng của stress oxy hóa ở nồng độ cao.

Nhìn chung, hiệu quả khử trùng cao không đồng nghĩa với khả năng tái sinh chồi tốt. Trong phạm vi nghiên cứu,  $\text{HgCl}_2$  0,05% xử lý trong 13 phút được xác định là công thức phù hợp nhất cho giai đoạn khởi đầu nuôi cấy mô Sa nhân đỏ, do đảm bảo sự cân đối giữa tỷ lệ mẫu sạch cao, tỷ lệ

nh nhiễm thấp và khả năng nảy chồi cao nhất.

### 3.2. Xác định phương pháp cấy mẫu thích hợp cho nuôi cấy mô Sa nhân đỏ

Các cụm chồi Sa nhân đỏ được cắt và cấy theo các phương pháp khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của phương pháp cấy đến khả năng tái sinh và nhân chồi. Sau 30 ngày nuôi cấy, số liệu thu được được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2. Xác định phương pháp cấy thích hợp cho nuôi cấy mô Sa nhân đỏ**

| Công thức \ Chỉ tiêu                                                                                                                              | Số chồi cấy ban đầu | Số chồi/cụm sau tái sinh | Chất lượng cụm chồi sau tái sinh                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CT11: Cắt bỏ lá, rễ, để lại 1 đoạn gốc có mắt chồi và cắm thẳng đứng các chồi đơn lẻ vào môi trường nuôi cấy, mỗi bình chồi cấy từ 8 - 10 chồi lẻ | 90                  | $1,19 \pm 0,62^b$        | Chồi mảnh, màu xanh nhạt, lá vươn lên cao, ít tạo cụm chồi, mỗi cụm chồi chỉ có từ 1 - 2 chồi non mọc lên |
| CT12: Lấy dao mổ chẻ làm đôi chồi lẻ Sa nhân đỏ theo hướng dọc thân và đặt nằm áp mặt cắt xuống môi trường, cấy từ 5 - 7 mẫu/bình môi trường      | 90                  | $3,02 \pm 1,13^a$        | Chồi mập, xanh đậm, cây khỏe, cụm chồi nhiều chồi non mọc lên, trung bình có 3 - 5 chồi non               |
| CT13: Không cắt lẻ chồi, không chẻ đôi thân, cấy theo các cụm chồi, mỗi cụm chồi từ 2 - 3 chồi, mỗi bình chồi cấy từ 3 - 5 cụm chồi               | 90                  | $0,10 \pm 0,30^c$        | Chồi xanh, chỉ phát triển về chiều cao. Chỉ có một vài bình chồi nảy thêm chồi mới, nhưng phát triển kém  |

*Ghi chú: Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean  $\pm$  SD),  $n = 90$ . Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$ , ANOVA 1 nhân tố.*



**Hình 1. Chồi Sa nhân đỏ được cắt và cấy theo các phương pháp khác nhau**

(a): Chồi được cắt và cấy theo CT11; (b): Chồi phát triển sau 30 ngày nuôi cấy (CT11); (c): Chồi được cắt và cấy theo CT12; (d): Chồi phát triển sau 30 ngày nuôi cấy (CT12); (e): Chồi được cắt và cấy theo CT13; (f): Chồi phát triển sau 30 ngày nuôi cấy (CT13).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, phương pháp cấy ảnh hưởng có ý nghĩa đến khả năng tái sinh chồi và chất lượng cụm chồi của Sa nhân đỏ ( $P < 0,05$ ). Trong các công thức khảo sát, CT12 cho hiệu quả cao nhất, với số chồi/cụm đạt  $3,02 \pm 1,13$ , cao hơn có ý nghĩa so với các công thức còn lại; các cụm chồi sinh trưởng khỏe, chồi mập, màu xanh đậm và khả năng phân hóa mạnh.

Ngược lại, ở CT11 và 13, chồi sinh trưởng kém, chủ yếu phát triển chiều cao, khả năng tạo cụm thấp, với số chồi/cụm lần lượt chỉ đạt  $1,19 \pm 0,62$  và  $0,10 \pm 0,30$ . Kết quả cho thấy, diện tích tiếp xúc của mặt cắt mẫu với môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thu dinh dưỡng và kích thích phân hóa chồi. Do đó, CT12 được xác

định là phương pháp cấy phù hợp cho giai đoạn nhân chồi Sa nhân đỏ *in vitro*.

### 3.3. Nhân chồi *in vitro*

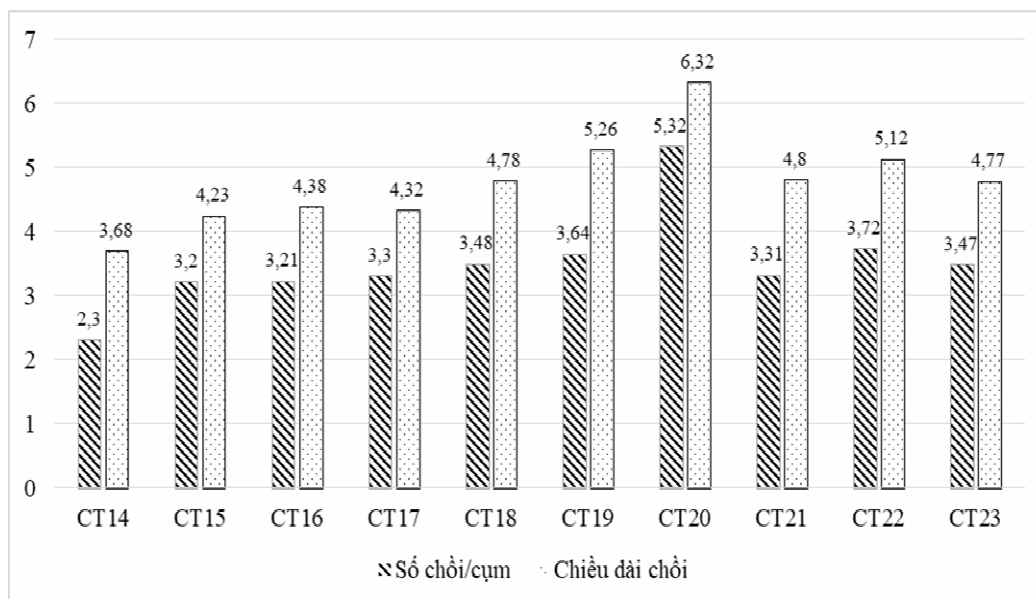
Giai đoạn nhân chồi nhằm đánh giá khả năng phát sinh chồi và chất lượng chồi của Sa nhân đỏ trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, làm cơ sở lựa chọn môi trường và tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng phù hợp cho các nghiên cứu nhân nhanh chồi ở các chu kỳ tiếp theo. Thí nghiệm được bố trí nhằm đánh giá hiệu quả phối hợp giữa các cytokinin (BAP, kinetin) và auxin (IBA, NAA) ở các nồng độ khác nhau. Các chồi sạch được cắt dài 1 - 2 cm và cấy 5 - 7 chồi/bình theo từng công thức thí nghiệm. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu về số chồi/cụm, chiều dài chồi và chất lượng chồi được theo dõi và tổng hợp trong bảng 3.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng phát sinh chồi Sa nhân đỏ nuôi cấy mô**

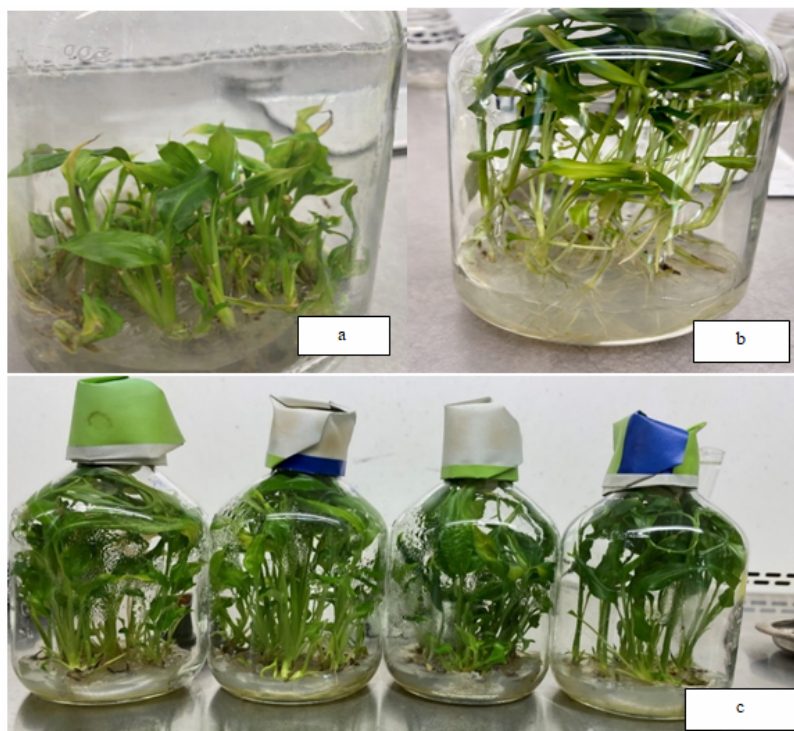
| Công thức                                                                 | Chỉ tiêu | Số chồi cấy ban đầu | Số chồi/cụm          | Chiều dài chồi (cm) | Chất lượng chồi |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| CT14: MS* không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (công thức đối chứng) |          | 90                  | $2,30 \pm 0,61^c$    | $3,68 \pm 0,70^d$   | +               |
| CT15: MS* + BAP 1 mg/l + IBA 0,1 mg/l                                     |          | 90                  | $3,20 \pm 0,54^c$    | $4,23 \pm 0,72^c$   | ++              |
| CT16: MS* + BAP 1 mg/l + IBA 0,5 mg/l                                     |          | 90                  | $3,21 \pm 0,83^c$    | $4,38 \pm 0,81^c$   | ++              |
| CT17: MS* + BAP 1 mg/l + IBA 1,0 mg/l                                     |          | 90                  | $3,30 \pm 0,85^c$    | $4,32 \pm 1,08^c$   | ++              |
| CT18: MS* + BAP 1 mg/l + KIN 0,1 mg/l                                     |          | 90                  | $3,48 \pm 0,89^{bc}$ | $4,78 \pm 0,70^b$   | ++              |
| CT19: MS* + BAP 1 mg/l + KIN 0,5 mg/l                                     |          | 90                  | $3,64 \pm 0,74^b$    | $5,26 \pm 0,97^b$   | +++             |
| CT20: MS* + BAP 1 mg/l + KIN 1,0 mg/l                                     |          | 90                  | $5,32 \pm 0,78^a$    | $6,32 \pm 1,02^a$   | +++             |
| CT21: MS* + BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l                                     |          | 90                  | $3,31 \pm 0,65^c$    | $4,80 \pm 0,77^b$   | ++              |
| CT22: MS* + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l                                     |          | 90                  | $3,72 \pm 1,09^b$    | $5,12 \pm 1,00^b$   | +++             |
| CT23: MS* + BAP 1 mg/l + NAA 1,0 mg/l                                     |          | 90                  | $3,47 \pm 1,06^{bc}$ | $4,77 \pm 1,09^b$   | ++              |

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean  $\pm$  SD),  $n = 90$ . Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$ . +: Sinh trưởng kém: Chồi ngắn, chiều dài trung bình dưới  $\sim 4,0$  cm; sinh trưởng chậm. Lá và thân chồi có màu xanh nhạt hoặc hơi vàng; màu sắc không đồng đều, ít lá (2 - 3 lá/chồi), lá nhỏ, bản lá hẹp. Chồi phát triển yếu, cụm chồi thưa; ++: Sinh trưởng trung bình: Chồi phát triển tương đối đồng đều, chiều dài trung bình khoảng 4,0 -*

5,0 cm. Chồi và lá có màu xanh tương đối đậm, ổn định. Trung bình 3 - 4 lá/chồi; lá phát triển cân đối. Chồi khỏe, ít dị dạng, sinh trưởng ổn định; +++: Sinh trưởng tốt: Chồi dài, sinh trưởng mạnh, chiều dài trung bình từ 5,0 - 6,0 cm. Chồi và lá có màu xanh đậm, bóng; mô chồi cứng cáp, có 3 - 4 lá/chồi hoặc hơn, lá to, bản lá rộng. Chồi phát triển khỏe mạnh, cụm chồi dày, hình thái đồng đều.



**Hình 2. Biểu đồ ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng phát sinh chồi Sa nhân đỏ nuôi cấy mô**



**Hình 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng phát sinh và sinh trưởng chồi Sa nhân đỏ *in vitro***

(a): Chồi được cấy trên môi trường MS\* không bổ sung chất ĐHST (CT14); (b): Chồi được cấy trên môi trường MS\* + BAP 1 mg/l + IBA 0,5 mg/l (CT16); (c): Chồi được cấy trên môi trường MS\* + BAP 1 mg/l + KIN 1,0 mg/l (CT20).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, thành phần và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) ảnh hưởng có ý nghĩa đến số chồi/cụm, chiều dài chồi và chất lượng chồi Sa nhân đỏ ( $P < 0,05$ ). Công thức đối chứng không bổ sung ĐHST cho hiệu quả nhân chồi thấp nhất, với số chồi/cụm và chiều dài chồi lần lượt đạt 2,30 chồi và 3,68 cm, chồi sinh trưởng kém.

Việc bổ sung BAP kết hợp với auxin (IBA hoặc NAA) giúp cải thiện khả năng nhân chồi so với đối chứng, với số chồi/cụm dao động 3,20 - 3,72 và chiều dài chồi 4,22 - 5,12 cm. Trong đó, BAP + NAA (0,5 mg/l) cho kết quả tốt nhất trong nhóm auxin (3,72 chồi/cụm; 5,12 cm), trong khi các công thức chứa IBA có xu hướng kích thích hình thành rễ sớm hơn là tăng hệ số nhân chồi. Ngược lại, phối hợp BAP và KIN cho hiệu quả nhân chồi vượt trội. Công thức MS\* + BAP 1,0 mg/l + KIN 1,0 mg/l đạt giá trị cao nhất với 5,32 chồi/cụm và chiều dài chồi 6,32 cm; chồi sinh trưởng khỏe, mập, đồng đều và lá xanh đậm.

Do chưa đánh giá tỷ lệ chồi hữu hiệu và chưa theo dõi chu kỳ cấy chuyển tiếp theo, nghiên cứu này chưa xác định hệ số nhân chồi theo đúng nghĩa,

mà sử dụng chỉ tiêu số chồi/cụm để phản ánh tiềm năng nhân chồi *in vitro* của Sa nhân đỏ dưới tác động của các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kết luận, trong phạm vi nồng độ chất điều hòa sinh trưởng được khảo sát, môi trường MS\* bổ sung BAP 1,0 mg/l + KIN 1,0 mg/l là công thức phù hợp nhất cho giai đoạn nhân chồi Sa nhân đỏ *in vitro*, phù hợp làm công thức nền cho các nghiên cứu đánh giá hệ số nhân chồi qua các chu kỳ cấy chuyển tiếp theo. Kết quả thu được tương đồng với kết quả nghiên cứu của Sajina và cs (1997) [11] trên cây Thảo quả (*Amomum subulatum* Roxb), qua đó khẳng định vai trò then chốt của cytokinin trong quá trình nhân nhanh chồi các loài thuộc chi *Amomum*.

### 3.4. Tạo cây hoàn chỉnh và xác định giá thể trồng cây ngoài vườn ươm

#### 3.4.1. Ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh

Chồi sau khi được nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh sẽ được chuyển sang môi trường cho ra rễ, khi đó trong môi trường có nồng độ auxin phù hợp sẽ kích thích chồi ra rễ. Đây là giai đoạn cuối cùng để tạo cây hoàn chỉnh trong môi trường *in vitro* trước khi đưa cây ra môi trường ngoài.

**Bảng 4. Kết quả ra rễ Sa nhân đỏ trên môi trường 1/2 MS\* + IBA 1 mg/l**

| STT | Môi trường           | Tỷ lệ ra rễ (%) | Số rễ/chồi  | Chiều dài rễ (cm) | Đặc điểm của cây, rễ cây                                                                             |
|-----|----------------------|-----------------|-------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 1/2 MS* + IBA 1 mg/l | 92,22 ± 26,93   | 4,47 ± 1,44 | 4,97 ± 1,53       | Cây cứng cáp, lá xanh đậm. Cây có nhiều rễ mới hình thành, rễ chính to, màu trắng, có nhiều lông hút |

Ghi chú: Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD), n = 90.



**Hình 4. Sa nhân đỏ ra rễ trên môi trường 1/2 MS bổ sung IBA 1 mg/l**

Sau khoảng 40 - 45 ngày nhân chồi, chọn những chồi có chiều cao từ 5 - 7 cm trở lên. Cây khỏe mạnh, mập, xanh tốt, không nhiễm là đạt

tiêu chuẩn cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Kết quả kết quả nghiên cứu trước đây của Phan Thị Hạnh (2022) [6], tạo rễ và hoàn thiện cây con trên

môi trường 1/2 MS\* có bổ sung 1 mg/l IBA trong vòng 30 ngày. Kết quả theo dõi được thể hiện trong bảng 4.

Sau 30 ngày nuôi cấy trong môi trường ra rễ, rễ Sa nhân đỏ được hình thành với tỷ lệ ra rễ đạt 92,22%, số rễ/chồi đạt 4,47 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 4,97 cm. Quan sát hình thái cho thấy, cây cứng cáp, lá xanh đậm, rễ mới hình thành nhiều, rễ trắng, rễ chính to và có nhiều lông hút, đây là những đặc điểm rất thuận lợi cho quá trình thích nghi và sinh trưởng của cây khi chuyển ra vườn ươm.

Trên cơ sở kế thừa kết quả nghiên cứu trước đây, môi trường 1/2 MS bổ sung IBA 1 mg/l được lựa chọn cho giai đoạn ra rễ, cho kết quả hình thành cây con Sa nhân đỏ có chất lượng tốt và hệ rễ phát triển hoàn chỉnh.

#### 3.4.2. Xác định giá thể ngoài vườn ươm

Cây con *in vitro* hoàn chỉnh được huấn luyện thêm 15 ngày để làm quen với điều kiện tự nhiên, cây trong bình có chiều cao khoảng 4,0 - 7,0 cm, với 3 - 5 lá.



Hình 5. Huấn luyện và tạo cây hoàn chỉnh Sa nhân đỏ *in vitro*

(a): Cây mô trong giai đoạn huấn luyện; (b): Cây mô sinh trưởng ổn định, hình thành cây hoàn chỉnh.

Sau thời gian huấn luyện, cây mô được đem rửa sạch thạch, ngâm trong dung dịch viben C 0,3% trong vòng 2 - 3 phút rồi cấy vào các loại giá thể thí nghiệm. Cây sau khi cấy vào giá thể được che nắng 50 - 60%, tưới phun cho đủ ẩm thường xuyên từ 70 - 80%. Sau 30 ngày cấy, kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, thành phần giá thể ra ngôi ảnh hưởng có ý nghĩa đến tỷ lệ sống và sinh trưởng ban đầu của cây con Sa nhân đỏ. Tỷ lệ

cây sống ở các công thức dao động từ 62,22 - 91,11%, chiều cao cây từ 4,07 - 7,0 cm, phản ánh sự khác biệt rõ rệt giữa các loại giá thể.

Giá thể 100% cát sông cho tỷ lệ sống tương đối cao và rễ phát triển nhanh, nhưng khả năng giữ ẩm và dinh dưỡng kém. Ngược lại, giá thể 100% đất phù sa cho tỷ lệ sống và sinh trưởng thấp nhất do kết cấu chặt, thoát nước kém. Giá thể 50% đất phù sa + 50% trấu hun cải thiện độ tơi xốp và khả năng sinh trưởng của cây con ở mức trung bình.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây con *in vitro* tại vườn ươm

| Công thức \ Chỉ tiêu  | Số cây ra ngôi | Tỷ lệ cây sống (%)          | Chiều cao cây (cm)        | Tình trạng cây con                                                         |
|-----------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| CT23: 100% cát sông   | 90             | 82,22 ± 38,45 <sup>ab</sup> | 6,27 ± 2,95 <sup>ab</sup> | Cây sinh trưởng khá, thân tương đối cứng, cây dễ bị khô, héo               |
| CT24: 100% đất phù sa | 90             | 62,22 ± 48,75 <sup>c</sup>  | 4,07 ± 3,21 <sup>c</sup>  | Cây sinh trưởng kém, chiều cao thấp, lá nhỏ và nhạt màu; rễ phát triển yếu |

| Chỉ tiêu<br>Công thức                                    | Số cây<br>ra ngôi | Tỷ lệ cây sống<br>(%)      | Chiều cao cây<br>(cm)    | Tình trạng cây con                                                                         |
|----------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| CT25: 50% đất phù sa +<br>50% trấu hun                   | 90                | 75,56 ± 43,22 <sup>b</sup> | 5,27 ± 3,02 <sup>b</sup> | Cây sinh trưởng tốt, lá xanh;<br>rễ phát triển ổn định                                     |
| CT26: 50% đất phù sa +<br>30% cát sông + 20%<br>trấu hun | 90                | 91,11 ± 28,63 <sup>a</sup> | 7,00 ± 2,23 <sup>a</sup> | Cây sinh trưởng tốt nhất, thân<br>cứng, lá xanh đậm; bộ rễ phát<br>triển mạnh, phân bố đều |

*Ghi chú: Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD), n = 90. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$ .*



**Hình 6. Cây con Sa nhân đỏ sinh trưởng tại vườn ươm sau 30 ngày ra ngôi**

Giá thể hỗn hợp 50% đất phù sa + 30% cát sông + 20% trấu hun cho kết quả tốt nhất, với tỷ lệ sống cao nhất (91,11%) và chiều cao cây đạt 7,0 cm; cây sinh trưởng khỏe, thân mập, lá xanh. Kết quả cho thấy, sự phối hợp cân đối giữa giữ ẩm, thoát nước và độ thông thoáng của giá thể là yếu tố quyết định giúp nâng cao tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con Sa nhân đỏ sau ra ngôi.

#### **4. KẾT LUẬN**

Khử trùng mẫu bằng  $HgCl_2$  0,05% trong thời gian 13 phút cho hiệu quả cao, đảm bảo tỷ lệ mẫu sạch và khả năng bật mầm tốt. Phương pháp cấy thích hợp cho Sa nhân đỏ là chẻ đôi chồi lẻ theo hướng dọc thân và đặt áp mặt cắt xuống môi trường, với mật độ 5 - 7 mẫu/bình, giúp nâng cao khả năng tái sinh chồi. Môi trường MS bổ sung BAP 1 mg/l kết hợp KIN 1 mg/l là phù hợp nhất cho giai đoạn nhân chồi, cho số chồi và chiều dài chồi đạt cao. Giai đoạn ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh đạt hiệu quả trên môi trường 1/2 MS bổ sung IBA 1 mg/l. Trong giai đoạn thuần dưỡng, giá thể gồm

50% đất phù sa + 30% cát sông + 20% trấu hun cho tỷ lệ sống cao và sinh trưởng tốt của cây con.

#### **LỜI CẢM ƠN**

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài khoa học và công nghệ cấp ngành: “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật đối với cây Sa nhân đỏ (*Amomum villosum* Lour.) để phát triển nguồn giống cho các HTX được liệu”. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Liên minh Hợp tác xã Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện để nghiên cứu được triển khai và hoàn thành.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Đinh Văn Tự (2001). *Cây Sa nhân*. Tài liệu chuyên đề, dự án sử dụng bền vững lâm sản ngoài gỗ Việt Nam.
- Nguyễn Tập (2007). *Sa nhân tím. Dự án hỗ trợ chuyên ngành lâm sản ngoài gỗ Việt Nam*. Nxb Lao động.
- Nguyễn Quốc Bình (2011). Nghiên cứu phân loại họ Gừng *Zingiberaceae* ở Việt Nam. Luận án Tiến sĩ Sinh học. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Võ Văn Chi (1997). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Tập và cộng sự (1995). Nghiên cứu bảo vệ tái sinh hai cây thuốc đặc sản Sa nhân, Vằng Đăng và tạo nguồn nguyên liệu chiết xuất berberin ở Việt Nam. *Báo cáo khoa học đề tài cấp Nhà nước KY.02.04*.
- Phan Thị Hạnh (2022). Nghiên cứu nhân giống cây Sa nhân đỏ (*Amomum villosum* Lour.) bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Luận

văn Thạc sĩ ngành Sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ.

7. Đặng Ngọc Phúc, Nguyễn Thanh Tùng, Dương Thị Thùy Châu, Trương Thị Bích Phương (2011). Nhân giống *in vitro* cây Sa nhân tím (*Amomum longiligulare* T.L.W). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 4A, 689 - 698.

8. Hong H, Na TL (2005). Tissue culture and plantlet regeneration of *Amomum villosum*. *Plant physiology communications*, 1, 57 - 61.

9. Hongdong X, Lei N, Yuchai X (2006). Tissue

culture and rapid propagation of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire. *Chinese wild plant resources*, 3, 61 - 63.

10. Rao M, Wenli Z, Fanhua W, Chunlin Q, Guixiu H (2003). *In vitro* culture of *Amomum longiligulare* T. L. Wu. *Chinese Journal of Tropical agriculture*, 4, 1 - 4.

11. Sajina A, Mini MP, John ZC, Babu NK, Ravindran NP, Perter VK (1997). Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb). *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 6, 145 - 148.

### ***In vitro* PROPAGATION OF *Amomum villosum* Lour. (ZINGIBERACEAE)**

**Phan Thi Hanh<sup>1</sup>, Phung Duc Hieu<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hoa<sup>1</sup>,**

**Nguyen Thi Lan Anh<sup>1</sup>, Luu Minh Nhat<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Science Technology and Environment*

#### **Abstract**

*Amomum villosum* Lour. (Zingiberaceae) is a valuable medicinal plant widely used in traditional medicine. Its fruits contain essential oils rich in bioactive compounds, including camphene,  $\beta$ -pinene, limonene, camphor, borneol and saponins, which exhibit antibacterial activity. This study aimed to evaluate the *in vitro* propagation of *A. villosum*. Rhizome explants bearing shoot buds were sterilized with 0.05% HgCl<sub>2</sub> for 13 minutes, resulting in the highest proportion of clean explants (87.78%) and a bud emergence rate of 55.56%. The optimal explant preparation method involved longitudinally splitting individual shoot buds and placing them horizontally with the cut surface in contact with the culture medium. Culturing 5 - 7 explants per vessel produced the highest regeneration efficiency, with an average of 3.02 shoots per cluster after 30 days. Maximum shoot regeneration was achieved on MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP and 1.0 mg/L KIN, yielding 5.32 shoots per cluster and an average shoot length of 6.32 cm after 40 - 45 days. During acclimatization, the most suitable potting substrate consisted of 50% alluvial soil, 30% river sand and 20% burnt rice husk, resulting in a survival rate of 91.11% and an average plant height of 7.0 cm after 30 days in the nursery.

**Keywords:** *Amomum villosum* Lour., sterilization, *in vitro* propagation, growth regulators, shoot regeneration.

**Ngày nhận bài:** 29/9/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 28/11/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 19/12/2025

**Ngày duyệt đăng:** 10/02/2026